



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 40 37 809 A 1

⑯ Int. Cl. 5:
A 61 K 37/48
A 61 K 37/02

DE 40 37 809 A 1

⑯ Aktenzeichen: P 40 37 809.8
⑯ Anmeldetag: 28. 11. 90
⑯ Offenlegungstag: 4. 6. 92

⑯ Anmelder:
Yousif Yehia Mohammed, 7800 Freiburg, DE

⑯ Erfinder:
gleich Anmelder

⑯ Anwendungen von staphylokokkal neutrale Phosphatase und 70 KD Protein

⑯ Grampositive Staphylokokkal Bakterien sind bekannt als Mitogenen Faktoren für B-Lymphozyten. Protein A war der maßgebliche Stimulierungsfaktor. Hochgereinigtes Protein A und rekombinantes Protein A hat keinen stimulierenden Effekt auf B Zellen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die gereinigten Lymphozytenstimulierungsfaktoren, Immunoglobulinen Bindungs faktoren, anzuwenden. Die Lösung der Aufgabe wird durch ein Reinigungs-Verfahren erreicht, dessen Zielsetzung die Trennung von Phosphatase und 70 kD Protein aus der gesamten Protein Lösung ist.

1. Stimulierung von Terminalen Blutzymphozyten und Immunoglobulinsynthese.

2. Abtrennung von Immunoglobulinen aus Lösungen durch Anwendung von immobilisierten Phosphatase und 70 kD Protein zur aktivierte soliden Phase Matrix.

DE 40 37 809 A 1

le verwendet.

IgG, IgM und IgA wurden in den zellfreien Kultur-
überständen mit Hilfe eines Peroxidase-ELISA-Sy-
stems gemessen.

Vorteilhaft wirkt sich die Phosphatase und 70KD Protein auf die B-Zellen als stimulierender Faktor aus. Gute Ergebnisse sind auch in geringer Konzentration (2 µg/ml) mit oder ohne IL-2 zu erzielen. Dieser Aktivierungs-Effekt war höher als der Effekt von intakten bak-
teriellen Zellen. Dies zeigt, daß die Phosphatase und 70KD Protein die Stimulatoren für B-Zellen sind.

II. Abtrennung von Immunoglobulin und Substrat von Phosphatase aus Lösungen durch Anwendung von immobilisierte Phosphatase und 70KD Proteine zu aktiviertem solidem Matrix

Aktiviertes solides Matrix (z. B. CN Br-aktivierten Se-
pharose 4B) wird mit Phosphatase und/oder 70KD Pro-
tein gekoppelt. Lyophilisierte Phosphatase oder 70KD Protein wird in Bindungs-Puffer (0,5M Na Phosphat pH 7,4) gelöst und mit dem entsprechenden Matrix (5–10 mg Protein/ml Matrix) bei 4°C für 3–12 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen 10 Volumen von 100 mM Äthanolamine pH 7,4 wird zugesetzt und bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen in PBS wird die entsprechende Probe dazu gegeben und bei Raumtemperatur für 4–12 Stunden inkubiert. Eine Säule wird mit Matrix abgefüllt und gewaschen. Das gebundene Material wird mit 100 mM Glycin pH 5 eluiert und dann neutralisiert. Das Matrix wird mit neutralem Tris maleate, 0,1% NaN₃ Puffer gewaschen und kann bei 4°C gelagert werden.

Die Ausbeute:

– 0,1 mg immobilisierte Phosphatase oder 70KD Protein kann 500 µg Polyklonal IgG, IgM, IgA oder F(ab)'2 Teilen binden.

Der Vorteil besteht darin, daß die immobilisierte Phosphatase oder 70KD Protein von ihren biologischen Eigenschaften so angelegt ist, daß sie sowohl Polyclonal IgG, IgM, IgA und Kappa myeloma Immunoglobulin bindet. Diese Affinität besteht auch für Human und Rat IgG insbesondere Kappa oder Polyclonal IgG. Phosphatase enzymatische Aktivität kann man auch für eine Substrat-Analog-Abtrennung benutzen.

Patentanspruch

Verfahren zur Anwendung von gereinigten aktiven Immunoglobulinen-Bindung-Staphylokokkal:

- Neutral Phosphatase.
- 70KD Protein.

Die Herstellung von Proteinen ist durch:

- Immunoaffinität-Reinigungs-Verfahren durch Anwendung von Anti-Phosphatase und Anti-70KD-Protein gekoppelte Antikörper zur aktiviertem Matrix,
- Ionenaustauschkromatography-Verfahren durch Anwendung von Kationenaustauscher-Matrix,
- Affinitätskromatography-Verfahren durch Anwendung von Immunoglobulin gekoppelt zur soliden Phase Matrix,

dadurch gekennzeichnet, daß man

1. eine Stimulation von terminalen Blutzellen und Immunoglobulinsynthese er-

füllt.

2. Abtrennung von Immunoglobulinen, F(ab)'2 Teilen und die Substrat-Analoga von Phosphatase aus Lösungen durch Anwendung von immobilisierten Phosphatase und 70KD Protein zur aktiviertem soliden Phase Matrix.

— Leerseite —